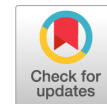


СЕКВЕНИРОВАНИЕ 16S-ITS-23S ФРАГМЕНТА РИБОСОМАЛЬНОГО ОПЕРОНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ НЕОБХОДИМЫЕ И ДОСТАТОЧНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ



О.Б. Огарков, С.Н. Жданова, Е.А. Орлова, П.А. Хромова, Н.Л. Белькова, В.В. Синьков, И.Г. Кондратов

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

Резюме. Введение. Секвенирование гена 16S рРНК является преобладающим методом количественной оценки состава микробных сообществ и молекулярной идентификации отдельных штаммов. При этом технология на основе коротких прочтений (секвенирование 2-го поколения) не позволяет выходить за рамки гена 16S рРНК, а уровень таксономической идентификации образцов обычно остается на уровне рода или даже семейства. В последние годы предлагается использование технологий длинных прочтений (Oxford Nanopore MinION, PacBio) для секвенирования ампликонов почти полного рибосомального оперона, включающего гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS). К настоящему моменту этот подход изучен недостаточно, кроме того предполагает ПЦР-амплификацию весьма протяженного участка ДНК (более 4000 п.н.). **Материалы и методы.** Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная идентификация осуществлена в 2019–2021 гг. Штаммы получены при высевае на среду Левенштейна–Йенсена положительных культур с бактериологического анализатора Bactec MGIT 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания) по протоколу производителя. В настоящей работе применяются как известные, так и разработанные вновь, универсальные бактериальные праймеры, фланкирующие почти полный ген 16S рРНК, ITS и начало гена 23S рРНК. **Результаты и обсуждение.** Секвенированием по Сэнгеру полученных ампликонов (около 2000 п.н.) показан уровень таксономической идентификации, достаточный для определения до вида 8 штаммов нетуберкулезных микобактерий, выделенных от людей, вызвавших клинически и бактериологически подтвержденные заболевания. Предложенная методика ПЦР-амплификации фрагмента бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация методического подхода по исследованию микробных сообществ из материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т. д.). Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей разрешающей способности использованного подхода, чем классическое секвенирование гена 16S рРНК.

Ключевые слова: молекулярная таксономия бактерий, секвенирование, 16S, ITS, rRNA operon, Mycobacterium.

Адрес для переписки:

Огарков Олег Борисович
664003, Россия, г. Иркутск ул. Тимирязева, 16,
ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека.
Тел.: 8 (3952) 20-73-67. E-mail: obogarkov@yandex.ru

Contacts:

Oleg B. Ogarkov
664003, Russian Federation, Irkutsk, Timiryaseva str., 16,
Scientific Center for Family Health and Human
Reproduction Problems.
Phone: +7 (3952) 20-73-67. E-mail: obogarkov@yandex.ru

Для цитирования:

Огарков О.Б., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А., Белькова Н.Л., Синьков В.В., Кондратов И.Г. Секвенирование 16S-ITS-23S фрагмента рибосомального оперона обеспечивает необходимые и достаточные условия для идентификации микобактерий // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 976–980. doi: 10.15789/2220-7619-ROS-1871

Citation:

Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A., Belkova N.L., Sinkov V.V., Kondratov I.G. 16S-ITS-23S rRNA operon segment sequencing provides necessary and sufficient conditions for bacterial species-specific identification // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 976–980. doi: 10.15789/2220-7619-ROS-1871

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 20-015-00078 А.

This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant 20-015-00078 A.

16S-ITS-23S rRNA OPERON SEGMENT SEQUENCING PROVIDES NECESSARY AND SUFFICIENT CONDITIONS FOR BACTERIAL SPECIES-SPECIFIC IDENTIFICATION

Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A., Belkova N.L., Sinkov V.V., Kondratov I.G.

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Introduction. Sequencing of the 16S rRNA gene is the predominant method for assessing microbial communities and strain molecular identification. The short reads (2nd generation sequencing)-based technology does not allow analysis beyond the 16S rRNA gene. The taxonomic verification level of samples usually remains at the genus or even family level. Currently, there have been proposed the latest versions of long-read technologies (Oxford Nanopore MinION, PacBio) for amplicon sequencing of near-complete ribosomal operon, including genes 16S, 23S, 5S, and internal transcribed spacer (ITS). At the moment, this approach has not been sufficiently studied, in addition, it involves PCR amplification of a very extended DNA region (more than 4000 bp-long). **Materials and methods.** The collection of non-tuberculous mycobacteria strains and their primary identification was carried out in the years 2019–2021. The strains were obtained by inoculation of positive cultures from the Bactec MGIT 960 bacteriological analyzer lacking MPT64 antigen in the MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, USA) on Lowenstein-Jensen medium. Preliminary species strain identification was carried out with the Speed-oligo Mycobacteria kit (Vircell, Spain) according to the manufacturer's protocol. In this work, both known and newly developed universal bacterial primers flanking the near-complete 16S rRNA gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene are used. In the present study, both known and newly developed universal bacterial primers are used to flank the near-complete 16S rRNA gene, ITS, and start of the 23S rRNA gene. **Results and discussion.** Sanger sequencing of the amplicons (about 2000 bp) obtained shows the taxonomic level sufficient to determine species up to 8 strains of non-tuberculous mycobacteria isolated from humans that caused clinically and bacteriologically confirmed diseases. The method proposed for PCR amplification of a bacterial operon a fragment containing most of the 16S rRNA gene, ITS, and the beginning of the 23S rRNA gene is considered by us as an approbation of a methodological approach to study microbial communities in material with a high degree of degradation (necrotic foci, etc.). The results obtained indicate a significantly higher resolution of the approach used than the classical 16S rRNA gene sequencing.

Key words: production of biofilms, sequencing, 16S, ITS, rRNA operon, Mycobacterium.

Введение

Ген 16S рНК десятилетиями используется для филогенетической классификации бактерий и архей. В этом отношении ген выделяется своей универсальностью, устойчивостью к горизонтальному переносу генов и высокой степенью сохранности [7, 15]. Высококонсервативные области перемежаются с высоковариабельными, что в ряде случаев позволяет проводить филогенетическую классификацию по видам и более высоким таксономическим уровням. Кроме того, этот ген оказался отличной мишенью для исследований, направленных на количественную оценку таксономического состава микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонов ПЦР [6]. Праймеры обычно конструируются таким образом, чтобы они гибридизовались с участками консервативных сайтов, фланкирующих вариабельную область, это позволяет извлечь наиболее полную информацию при изучении микробных сообществ. Несмотря на свои многочисленные преимущества, ген 16S рНК имеет ограниченное количество филогенетически информативных сайтов. Филогенетический анализ на основе гена 16S рНК чувствителен к стохастической ошибке и демонстрирует разрешение, во многих случаях ограниченное родом микроорганизма [3, 5]. Нуклеотидная последовательность гена 16S рНК широко использу-

ется платформами на основе секвенирования коротких прочтений [4], однако эта технология не позволяет расширить рамки мишени [9]. Для секвенирования ампликонов полного рибосомального оперона в последние годы предлагается использование технологий длинных прочтений, таких как Oxford Nanopore MinION и PacBio [2, 9]. Этот подход позволяет включить в исследование гены 16S, 23S, 5S и межрибосомальный транскрибируемый спейсер (ITS). Область полного рибосомального оперона 16S-ITS-23S имеет в четыре раза больше вариабельности, чем одна только область 16S, и может использоваться для таксономической классификации на уровне вида, а в некоторых случаях на уровне штамма [2]. В настоящее время ведется активная работа по разработке инструментов для анализа результатов NGS микробных сообществ полных рибосомальных оперонов бактерий [10, 12], в том числе в очагах туберкулеза [11]. Существенным недостатком этого подхода является почти предельная для стандартной ПЦР длина ампликона (более 4000 п.н.), что может существенно исказить количественную оценку исследуемых видов при изучении микробных сообществ. Задачей настоящего исследования был дизайн и апробация эубактериальных праймеров для амплификации участка 16S-ITS-23S рибосомального оперона при длине ампликона около 2000 п.н., оптимальной для большинства коммерческих Taq-полимераз.

Таблица. Сравнительная идентификация секвенированием по Сэнгеру и тест-системой Speed-oligo «Mycobacteria»

Table. Sanger sequencing and the Speed-oligo test system of "Mycobacteria" for comparative identification

№ штамма Strain number	Мишень Target	Длина, п.н. Lenght	Сходство [NCBI Blastn, Genome DataBase; RefSeq; Mycobacteria (taxid:85007)] Similarity [NCBI Blastn, Genome DataBase; RefSeq; Mycobacteria (taxid:85007)]	Результат по тестам Speed-oligo Speed-oligo test result	Вид, определенный секвенированием Species determined by sequencing
MOT1	16S-ITS- 23S	1904	> 99% (1901/1904) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (36 штаммов) > 99% (1901/1904) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (36 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (MAC)
MOT2	16S-ITS- 23S	1900	> 99% (1898/1899) <i>Mycobacterium gordonae</i> (8 штаммов) > 99% (1898/1899) <i>Mycobacterium gordonae</i> (8 штаммов) > 99% (1891/1899) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 штаммов) > 99% (1891/1899) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium gordonae</i>
MOT3	16S-ITS- 23S	1960	100% (1960/1960) <i>Mycolicibacterium holsaticum</i> штамм M7 PROKKA 100% (1960/1960) <i>Mycolicibacterium holsaticum</i> M7 PROKKA strain 95% (1882/1960) <i>Mycolicibacterium gadium</i> strain JCM 12688 95% (1882/1960) <i>Mycolicibacterium gadium</i> strain JCM 12688	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Mycolicibacterium holsaticum</i>
MOT4	16S-ITS- 23S	1475	> 99% (1473/1475) <i>Mycolicibacterium fortuitum</i> (27 штаммов) > 99% (1473/1475) <i>Mycolicibacterium fortuitum</i> (27 strains)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycolicibacterium fortuitum</i>
MOT6	16S-ITS- 23S	1909	> 99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 штаммов) > 99% (1907/1909) <i>Mycobacterium paragordonaе</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium paragordonaе</i>
MOT7	16S-ITS- 23S	1920	> 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (32 штаммов) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> (32 strains) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium bouchedurhonense</i> штамм DSM 45439 > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium bouchedurhonense</i> strain DSM 45439 > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (37 штаммов) > 99% (1918/1920) <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (37 strains)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium avium</i> (MAC)
MOT8	16S-ITS- 23S	1917	> 99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 штаммов) > 99% (456/458) <i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (98 strains)	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>
MOT9	16S-ITS- 23S	1551	> 99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 штаммов) > 99% (1550/1551) <i>Mycobacterium mantenii</i> (6 strains)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> (MAC)	<i>Mycobacterium mantenii</i> (MAC)

Материалы и методы

Сбор штаммов нетуберкулезных микобактерий и их первичная идентификация осуществлена в рамках некоммерческого сотрудничества с ОГБУЗ Иркутская Областная Туберкулезная Больница в 2019–2021 гг. Штаммы получены при высевах на среду Левенштейна–Йенсена положительных культур с бактериологического анализатора Vactec MGIT 960, не имеющих антигена МРТ64 в иммунохроматографическом тесте MGIT TB Identification Test (Becton Dickinson, США). Предварительная видовая идентификация штаммов осуществлена набором Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания) по протоколу производителя. Данный тест предполагает ПЦР амплификацию ДНК фрагментов 16S рРНК и ITS с последующей гибридизацией ампликонов с олигонуклеотидными зондами на хроматографической тест-полоске. Секвенирование по Сэнгеру фрагментов 16S-ITS-23S рРНК проведено на базе ЗАО «Евроген». В работе изначально планировалось использовать 9 культур нетуберкулезных микобактерий (MOT — Mycobacterium other than tuberculosis), однако одна из культур по результатам секвенирования по Сэнгеру была исключена, как смесь нескольких видов микроорганизмов. В дальнейшем исследовались 5 медленно растущих (MOT1, MOT2, MOT6, MOT7, MOT9) и 3 быстро растущих штамма микобактерий (MOT3, MOT4, MOT8).

ПЦР в течение 37 циклов выполняли с праймерами 27F и 189R (синтезированы ЗАО «Евроген») в концентрации 500 нмоль каждого с реактивами AmpliTaqGold 360 MasterMix (Applied Biosystems, США) в присутствии 1× раствора энхансера на амплификаторе CFX-96 (BioRad, США). Режим амплификации: 95°C — 10 мин, активация полимеразы; 95°C — 60 с; 55°C — 30 с; 72°C — 120 с. Нами использована структура широко известного зубактериального праймера 27F 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG [13, 14], берущего старт в начале гена 16S рРНК. Праймер 189R 5'-GGGAAGTGAACATCTHAGTA, гибридизующийся в начале гена 23S рРНК, сконструирован с учетом известной вариабельности гена 23S рРНК [8], структура праймера проверена в сервисах SILVA rRNA database (<https://www.arb-silva.de>) и Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Список литературы/References

1. Bel'kova N.L., Parfenova V.V., Kostornova T.Ya., Denisova L.Ya., Zaichikov E.F. Microbial biodiversity in the water of lake Baikal. *Microbiology*, 2003, vol. 72, pp. 203–213. doi: 10.1023/A:1023224215929
2. Benítez-Páez A., Sanz Y. Multi-locus and long amplicon sequencing approach to study microbial diversity at species level using the MinION™ portable nanopore sequencer. *Gigascience*, 2017, vol. 6, no. 7, pp. 1–12. doi: 10.1093/gigascience/gix043
3. Brown J.R., Douady C.J., Italia M.J., Marshall W.E., Stanhope M.J. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat. Genet.*, 2001, vol. 28, no. 3, pp. 281–285. doi: 10.1038/90129
4. Burke C.M., Darling A.E. A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. *Peer J.*, 2016, vol. 4: e2492. doi: 10.7717/peerj.2492

Секвенирование по Сэнгеру выполнялось в ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск), с использованием праймеров 27F, 189R и внутреннего 800L 5'-AGGATTAGATACCCTGGTAGTC (ген 16S рРНК) [1].

Результаты и обсуждение

Нуклеотидные последовательности фрагментов рибосомального оперона 16S-ITS-23S образцов MOT1, MOT2, MOT3, MOT4, MOT6, MOT7, MOT8, MOT9 размещены в GenBank под номерами MZ823582, MZ851786, MZ851787, MZ851788, MZ851789, MZ851790, MZ851791, MZ851792 соответственно. Как видно из таблицы, в одном случае (MOT3) в рамках предлагаемого подхода определен вид возбудителя, ранее не установленный коммерческим тестом Speed-oligo Mycobacteria (Vircell, Испания). В двух случаях (MOT6 и MOT9) изменена видовая принадлежность штамма. В остальных случаях наблюдалось совпадения результатов коммерческого теста с результатами секвенирования по Сэнгеру, при этом в двух случаях (MOT1 и MOT8) удалось провести идентификацию таксонов до подвида.

Заключение

Предложенная методика ПЦР амплификации фрагмента бактериального оперона, содержащего большую часть гена 16S рРНК, весь ITS и начало гена 23S рРНК, рассматривается нами как апробация методического подхода по исследованию микробных сообществ из материала с высокой степенью деградации (некротических очагов и т. д.). Полученные результаты свидетельствуют о значительно большей разрешающей способности использованного подхода, чем классическое секвенирование гена 16S рРНК. Авторы предполагают, что предложенный подход может получить в дальнейшем широкое распространение при исследовании микробных сообществ как секвенированием по Сэнгеру клонированных образцов, так и с помощью NGS-технологий длинных прочтений, таких как Oxford Nanopore MinION и PacBio.

5. Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, vol. 6, no. 5, pp. 361–375. doi: 10.1038/nrg1603
6. Doolittle W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*, 1999, vol. 284, no. 5423, pp. 2124–2129. doi: 10.1126/science.284.5423.2124
7. Green R., Noller H.F. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, vol. 66, pp. 679–716. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.679
8. Hunt D.E., Klepac-Ceraj V., Acinas S.G., Gautier C., Bertilsson S., Polz M.F. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 2221–2225.
9. Martijn J., Lind A.E., Schön M.E., Spiertz I., Juzokaite L., Bunikis I., Pettersson O.V., Ettema T.J.G. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon. *Environ. Microbiol.*, 2019, vol. 21, no. 7, pp. 2485–2498. doi: 10.1111/1462-2920.14636
10. Milani C., Alessandri G., Mangifesta M., Mancabelli L., Lugli G.A., Fontana F., Longhi G., Anzalone R., Viappiani A., Duranti S., Turroni F., Costi R., Annicchiarico A., Morini A., Sarli L., Ossiprandi M.C., van Sinderen D., Ventura M. Untangling species-level composition of complex bacterial communities through a novel metagenomic approach. *mSystems*, 2020, vol. 5, no. 4: e00404-20. doi: 10.1128/msystems.00404-20
11. Orlova E.A., Ogarkov O.B., Suzdalnitskiy A.E., Khromova P.A., Sinkov V.V., Plotnikov A.O., Belkova N.L., Zhdanova S.N. Analysis of microbial diversity in caseous necrosis of tuberculosis foci. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, 2021, vol. 36, pp. 132–138. doi: 10.3103/S0891416821030058
12. Peker N., Garcia-Croes S., Dijkhuizen B., Wiersma H.H., van Zanten E., Wisselink G., Friedrich A.W., Kooistra-Smid M., Sinha B., Rossen J.W.A., Couto N. A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 620. doi: 10.3389/fmicb.2019.00620
13. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
14. Wilson K.H., Blichington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 9, pp. 1942–1946. doi: 10.1128/jcm.28.9.1942-1946.1990
15. Woese C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 1987, vol. 51, pp. 221–271. doi: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987

Авторы:

Огарков О.Б., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Зданова С.Н., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Орлова Е.А., младший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Хромова П.А., младший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Белькова Н.Л., к.б.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Синьков В.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия;

Кондратов И.Г., к.б.н., научный сотрудник отдела эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Ogarkov O.B., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Zhdanova S.N., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Orlova E.A., Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Khromova P.A., Junior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Belkova N.L., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Sinkov V.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation;

Kondratov I.G., PhD (Biology), Researcher, Department of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.